第44卷 第2期
2001年5月

昆　虫　学　报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.44, No.2
May, 2001

粉纹夜蛾颗粒体病毒增效基因3′端2.5 kb片段在大肠杆菌中的表达

袁哲明[1*]，孟小林[2**]，刘树生[1]

（1. 浙江大学应用昆虫学研究所，杭州　310029；2. 武汉大学病毒学研究所，武汉　430072）

摘要：将粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 颗粒体病毒增效基因3′端2.5 kb片段插入pQE-31中构建了重组表达载体pQE/enhancin，转化大肠杆菌M15（$pREP_4$）在IPTG诱导下成功表达出分子量约为96 kD的融合蛋白并命名为P96。初步纯化的P96显示了明显的增效活性，可提高棉铃虫核型多角体病毒对棉铃虫3龄幼虫感染死亡率27.40%～34.50%，缩短LT_{50} 1.9天以上。

关键词：粉纹夜蛾颗粒体病毒；增效基因；克隆；表达；生物测定

中图分类号：Q786　　　**文献标识码**：A　　　**文章编号**：0454-6296（2001）02-0155-06

1959年Tanada首次发现美洲粘虫颗粒体病毒（*Pseudaletia unipuncta* granulosis virus，PuGV）对美洲粘虫核型多角体病毒（nuclear polyhedrosis virus，NPV）的感染有促进作用，随后在粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 颗粒体病毒（TnGV）等9种GV和舞毒蛾 *Lymantria dispar* NPV以及东方粘虫痘病毒（*Pseudaletia separata* entomopoxvirus，PsEPV）等4种EPV共计14种昆虫病毒中发现了增效蛋白（enhancin）的存在，其中TnGV等6种病毒增效基因（enhancin gene）的核苷酸序列已测定[1~6]。纯化的天然增效蛋白在体外能促进NPV对昆虫离体细胞系的感染，在体内能显著提高NPV对昆虫幼虫的感染效果，并可增强苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*，Bt）对幼虫的毒力[7~9]。其作用机理主要是通过降解宿主中肠的肠粘蛋白和糖蛋白而破坏围食膜，使病毒粒子更易进入中肠细胞；另一方面也与促进病毒核衣壳与细胞质膜的融合有关[10,11]。

TnGV增效蛋白分子量为104.3 kD，编码该蛋白的开放阅读框为2 703 bp，属晚期表达基因[2]。前人将该基因插入苜蓿银纹夜蛾 *Autographa californica* NPV的p10基因启动子下游构建的重组病毒毒力未见明显提高，仅当与野生型病毒混合感染时具协同杀虫活性（Rincon-Castro等，1998，私人通讯；Zhong等，1998，私人通讯）。同时因该基因较长，其在原核细胞中的表达量将受到制约，也难以与Bt毒蛋白基因耦联构建工程菌株，故有必要研究该基因一级结构与功能的关系，了解其活性功能区。为此，我们构建了一系列含该基因全长、去除5′端片段、去除3′端片段的克隆。本文报道该基因3′端2.5 kb片段在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中的克隆与表达，并对表达产物的增效活性作了初步研究。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39570034）

* 现在湖南农业大学作物学博士后流动站工作，邮编　410128

** 通讯作者

收稿日期：1999-05-04；接受日期：2000-07-10

1 材料与方法

1.1 实验材料

含 TnGV 全长增效基因的重组质粒 pGEM-T/enhancin 由本室构建[12]，质粒 pQE-31、大肠杆菌 M15（pREP$_4$）、Ni-NTA 树脂纯化系统购自 Qiagen 公司，大肠杆菌 DH5α 由本室保存，限制性内切酶、T$_4$DNA 连接酶等购自华美生物技术公司，棉铃虫 *Helicoverpa armigera* NPV（简称 HaNPV）由武汉大学病毒所提供，棉铃虫幼虫由湖北省农科院 Bt 研究开发中心养虫室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 重组表达质粒 pQE/enhancin 的构建：用 *Sph* Ⅰ/*Pst* Ⅰ 分别双酶切质粒 pQE-31 和重组质粒 pGEM-T/enhancin，并经 0.7%低熔点琼脂糖凝胶电脉纯化回收目的片段，用 T$_4$DNA 连接酶于 16℃ 水浴连接过夜，转化大肠杆菌 M15（pREP$_4$）感受态细胞，经 Ampicillin 和 Kanamycin 双抗平板筛选得阳性转化子[13]。

1.2.2 pQE/enhancin 的酶切鉴定：阳性转化子 DNA 分别用 *Pst* Ⅰ、*Sal* Ⅰ单酶切和 *Pst* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ 双酶切后经 0.7%琼脂糖凝胶电泳照相。

1.2.3 增效基因的表达：挑重组子单菌落接种 5 mL LB 培养液（含 Ampicillin 100 μg/mL 和 Kanamycin 25 μg/mL，下同）活化过夜。活化菌液全部接种于 20 mL 新 LB 培养液，37℃ 培养 1 h，加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L，37℃诱导 4 h，取未诱导和诱导 1 h、2 h、3 h、4 h 培养物各 1 mL 收集菌体备作 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.4 表达产物的纯化：离心收集诱导后菌体，加溶液Ⅰ（50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0，0.5 mmol/L EDTA，30%蔗糖，2 mg 溶菌酶）5 mL 重悬，置于 37℃ 1 h，4℃过夜，冰浴超声波破碎 5～10 min，单蒸水洗糖 3 次，加无菌水 1 mL，混匀取少许稀释后于透射电镜下观察包涵体纯度并照相；另取适量按 Qiagen 公司所附说明书操作步骤用 Ni-NTA 树脂柱层析纯化后电泳检测。剩余包涵体样品 4℃保存备作生物测定。

1.2.5 生物测定：将 HaNPV 和初步纯化的表达产物（命名为 P96）作 10 倍系列稀释并用血球计数板计数。设①Ha3：即 HaNPV 1.6×10^3 PIBs/mL（polyhedra inclusion bodies，多角体）；②Ha4：即 HaNPV 1.6×10^4 PIBs/mL；③Ha3P96：即（HaNPV 1.6×10^3 PIBs + P96 1.9×10^6 OBs）/mL（occlusion bodies，包涵体）；④Ha4P96：即（HaNPV 1.6×10^4 PIBs + P96 1.9×10^6 OBs）/mL 4 个处理。另设单蒸水对照和 P96 1.9×10^6 OBs/mL 对照。室温下将棉铃虫 3 龄初幼虫单虫饲于 6 孔 Costar® 细胞培养皿中，每孔加适量人工饲料，并加 10 μL 上述各处理液于人工饲料表面，使之充分吸收。幼虫取食 48 h 后补加足量新鲜人工饲料。逐日记载死亡和存活虫数。

2 结果与分析

2.1 pQE/enhancin 的构建与酶切鉴定

重组表达质粒 pQE/enhancin 的构建过程如图 1。根据已报道的 TnGV 增效基因序列及

pQE/enhancin 的构建过程，pQE/enhancin 经 *Pst* Ⅰ、*Sal* Ⅰ单酶切，各应得 5.9 kb 片段；经 *Pst* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ双酶切，应得 3.4 kb 和 2.5 kb 片段。大肠杆菌 M15 自身尚带有质粒 $pREP_4$（3.7 kb），经 *Pst* Ⅰ酶切产生 2.7 kb 和 1.0 kb两片段；经 *Sal* Ⅰ酶切产生 2.5 kb 和 1.2 kb两片段；$pREP_4$ 上不存在 *Eco*R Ⅰ的识别序列。凝胶电泳结果与预期相符（图 2）。

2.2　增效基因的表达

表达产物的 10% SDS-PAGE 如图 3。结果表明，增效基因 3′端 2.5 kb 片段在大肠杆菌 M15 中受 T_5 启动子驱动表达了含增效蛋白 C-端 818 个氨基酸、总长 831 个氨基酸的融合蛋白（命名为 P96）；其分子量约为 96 kD，与预期结果相符。随诱导时间延长，P96 表达量增加，表明其未被降解。表达产物经能特异吸附 6 个组氨酸接头的 Ni 柱纯化后得到 96 kD 分子量的单一条带，进一步证实目的基因表达成功。在 37℃ 诱导表达时，P96 形成不溶于水的包涵体（图 4）。该蛋白质晶体相当稳定，4℃ 水溶液中长期存放无明显降解。

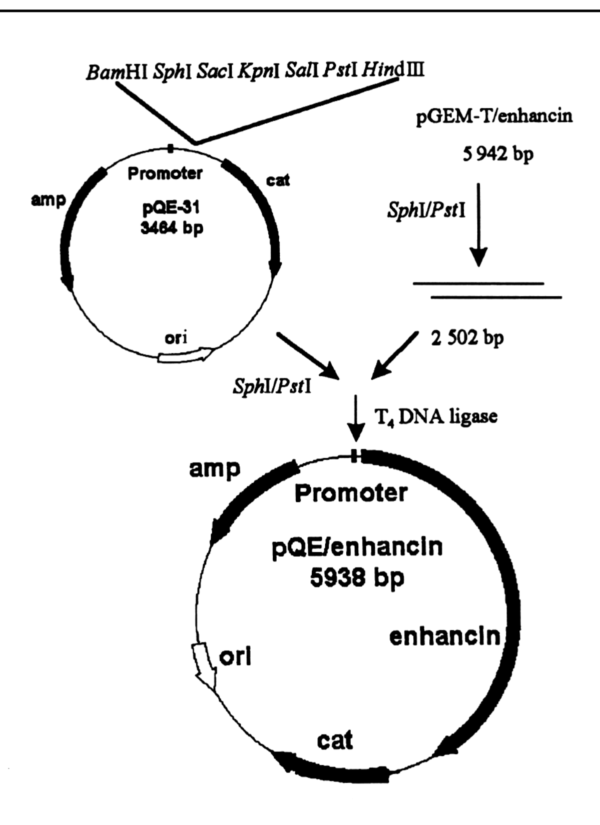


图 1　重组表达质粒 pQE/enhancin 的构建

Fig.1　Construction of the recombinant plasmid pQE/enhancin

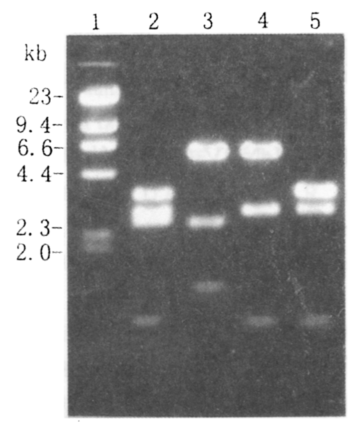


图 2　pQE/enhancin 的酶切鉴定

Fig. 2　Electrophoretogram of restriction endonucleases digestion fragments for pQE/enhancin

1. DNA marker; 2. pQE/enhancin + *Pst* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ; 3. pQE/enhancin + *Sal* Ⅰ; 4. pQE/enhancin + *Pst* Ⅰ; 5. pQE-31 + *Pst* Ⅰ

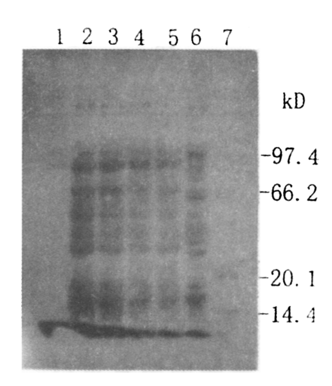


图 3　pQE/enhancin 在大肠杆菌 M15（$pREP_4$）中表达产物的 10% SDS-PAGE 分析

Fig. 3　SDS-PAGE analysis of proteins from pQE/enhancin expressed in *E. coli* M15 ($pREP_4$)

1. 经 Ni 柱纯化后的表达产物 purified with Ni-NTA; 2. 诱导 4 h induced 4 h; 3. 诱导 3 h induced 3 h; 4. 诱导 2 h induced 2 h; 5. 诱导 1 h induced 1 h; 6. 未诱导 uninduced; 7. 蛋白质标记 protein marker

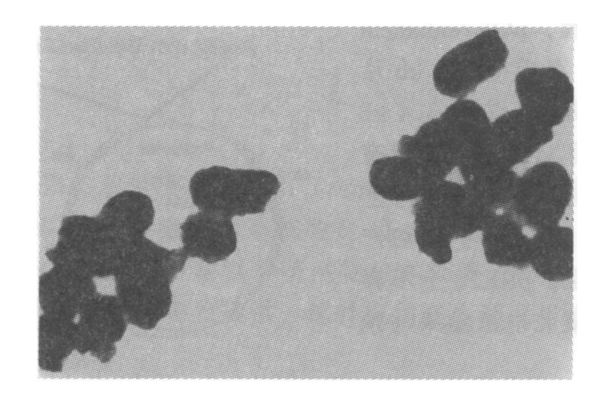


图4 P96形成的包涵体

Fig. 4 Occlusion bodies formed by P96 (2 800×)

表1 P96对HaNPV感染棉铃虫幼虫的增效活性

Table 1 The synergy of P96 on HaNPV against larvae of *H. armigera*

	供试虫数(头) Number of larvae treated	感染后11天死亡率(%) Mortality on the 11th day post-infection
单蒸水 water control	30	0
P96	30	0
Ha3	54	11.11
Ha3P96	57	45.61
Ha4	60	46.67
Ha4P96	54	74.07

2.3 P96对HaNPV的增效活性

结果如表1。尽管P96自身未对幼虫产生致死效应，但可提高HaNPV对棉铃虫3龄幼虫感染死亡率27.40%～34.50%。对Ha4P96处理，死亡机率值Y与感染后天数T（天）有如下关系：$Y=0.5653+0.4888T$（$\chi^2=9.384$，$\chi^2_{(0.05,10)}=18.307$，$LT_{50}=9.1$）。由于Ha4处理幼虫感染后11天累积死亡率小于50%，因此对该浓度的HaNPV而言，P96可缩短LT_{50} 1.9天以上。Ha3P96与Ha4处理的幼虫死亡率接近，表明P96可降低HaNPV的用量约90%。

3 讨论

（1）双质粒pQE-M15（$pREP_4$）表达载体系统因其具以下优点而颇值关注：①表达产物为带6个连续组氨酸的融合蛋白，稳定易纯化；②M15自身携带的$pREP_4$具kanamycin抗性，菌种不易污染；③$pREP_4$产生的Lac抑制子可紧密调控外源基因的表达，表达成功率高；④pRSET在宿主菌BL21（DE3）中常易丢失，故须保存于DH5α中，表达前再转化BL21（DE3）；而pQE-31及重组子在M15中甚为稳定。

（2）一般认为真核基因在原核细胞表达时因不能进行翻译后的糖基化修饰等，表达产物的生物活性将完全或部分丧失[14]。我们在原核表达的增效蛋白P96显示了较强的增效活性。尽管TnGV和PuGV的增效蛋白氨基酸序列中均有12个可能的糖基化位点，但天然增效蛋白含糖量很少，低于糖蛋白染色检出限，暗示该基因在翻译后并未进行糖基化修饰[2,3,15]。

PsEPV 增效蛋白氨基酸序列中也含潜在的糖基化位点，其在大肠杆菌中的表达产物同样具较高的生物活性（Hukuhara 等，1998，私人通讯）。因此，我们认为是否糖基化不是增效蛋白有无生物活性的决定性因素，其丰富的糖基化位点可能与其对宿主中肠围食膜上糖蛋白的结合、降解有关[10,11]。

（3）大肠杆菌表达系统具生产工艺简单、成本低等特点，表达产物形成包涵体稳定易纯化，可与不同病毒及 Bt 混用。本研究中由于人工饲料含有防腐剂，P96 破坏围食膜后细菌、真菌等引起的致死效应未能显现。同时，TnGV 增效蛋白对紫外线照射的抗性比病毒粒子高 10 倍，因此预期有较理想的田间应用前景[16]。

参 考 文 献 （References）

[1] Tanada Y. Synergism between two viruses of the armyworm，*Pseudaletia unipuncta*. J. Insect. Pathol.，1959，1（2）：215～231

[2] Hashimoto Y，Corsaro B G，Granados R R. Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus. J. Gen. Virol.，1991，72（11）：2 645～2 651

[3] Roelvink P W，Corsaro B G，Granados R R. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancin genes. J. Gen. Virol.，1995，76（11）：2 693～2 705

[4] Hayakawa T，Xu J H，Hukuhara T. Cloning and sequencing of the gene for an enhancing factor from *Pseudaletia separata* entomopoxvirus. Gene，1996，177（2）：269～270

[5] 孟小林，叶林柏，Chen chiju 等. 小菜蛾颗粒体病毒增效因子的研究. 武汉大学学报（自然科学版），1996，42（4）：519～522

[6] Bischoff D S，Slavicek J M. Molecular analysis of an enhancin gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol.，1997，71（11）：8 133～8 140

[7] Tanada Y. A synopsis of studies on the synergistic property of an insect baculovirus：a tribute to Edward A Steinhaus. J. Invertebr. Pathol.，1985，45（2）：125～138

[8] Xu J H，Hukuhara T. Enhanced infection of a nuclear polyhedrosis virus in larvae of the armyworm，*Pseudaletia separata*，by a factor in the spheroids of an entomopoxvirus. J. Invertebr. Pathol.，1992，60（3）：259～264

[9] 丁　翠，邓　塔，蔡秀玉. 粘虫颗粒体病毒的增效因子提高杆状病毒的感染. 昆虫学报，1995，38（4）：407～413

[10] Wang P，Hammer D A，Granados R R. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus encoded enhancin with the midgut epithelium and peritropic membrane of four lipidopteran insects. J. Gen. Virol.，1994，75（8）：1 961～1 967

[11] Wang P，Granados R R. An intestinal mucin is the target for a baculovirus enhancin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA，1997，94（14）：6 977～6 982

[12] 刘　平，孟小林，吕颂雅等. 粉纹夜蛾颗粒体病毒增效蛋白基因的 PCR 扩增及其克隆. 武汉大学学报（自然科学版），1998，44（杀虫微生物专刊）：110～112

[13] Sambrook J，Fritsch E F，Maniatism T. 分子克隆实验指南，第 2 版，金冬雁等译. 北京：科学出版社，1996. 16～57

[14] Ausubel F M，Brent R，Kingston R E *et al*. 精编分子生物学实验指南，颜子颖等译. 北京：科学出版社，1998. 625～628

[15] 刘　强，丁　翠，蔡秀玉. 粘虫颗粒体病毒增效因子的分离纯化及其生化性质. 病毒学报，1998，14（4）：352～358

[16] Derksen A C G，Granados R R. Alteration of lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. Virology，1988，167（1）：242～250

Cloning and expression of 2.5 kb enhancin gene from *Trichoplusia ni* granulosis virus in *Escherichia coli*

YUAN Zhe-ming[1], MENG Xiao-lin[2*], LIU Shu-sheng[1]

(1. Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;
2. Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The 2.5 kb fragment of enhancin gene in 3′ terminal from *Trichoplusia ni* granulosis virus was inserted into vector pQE-31 and expressed successfully in *Escherichia coli* M15 ($pREP_4$). The synergy of the expression product (P96) on *Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis virus (HaNPV) against the 3rd instar larvae of *H. armigera* was also studied. The results indicated that the percentage of accumulated mortality of the larvae increased by 27.40% ~ 34.50% on the 11th day postinfection and the median lethal time decreased at least by 1.9 days in HaNPV + P96 treated compared with those in HaNPV treated.

Key words: *Trichoplusia ni* granulosis virus; enhancin gene; cloning; expression; bioassay

* To whom correspondence should be addressed